

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Lucie Steiningerová

Společné rysy biosyntetických drah linkomycinu, některých
pyrrolo-1,4-benzodiazepinů a hormaomycinu

Common features of the biosynthetic pathways of lincomycin,
some pyrrolo-1,4-benzodiazepines and hormaomycin

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

školitel: Ing. Jiří Janata, CSc.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 10. 5. 2013

.....
Lucie Steiningerová

Ráda bych zde poděkovala zejména vedoucímu bakalářské práce Ing. Jiřímu Janatovi, CSc., za poskytnutí odborných rad, věcné připomínky, ochotu a vstřícný přístup během zpracovávání mé bakalářské práce. Rovněž bych chtěla poděkovat Mgr. Petře Jiráčkové za trpělivost, čas a pomoc nejen při realizaci této práce.

Obsah

Abstrakt.....	6
Klíčová slova.....	6
Seznam použitých zkratk8	
1. Úvod	9
2. Vymezení základních pojmů.....	10
2.1. Sekundární metabolismus a charakteristika jeho produktů	10
2.2. Antibiotika – důležitý sekundární metabolit.....	10
2.3. Streptomycety jsou významnými producenty antibiotik	11
2.3.1. Genom streptomycet odráží produkci sekundárních metabolitů	11
2.4. Horizontální genový přenos jako nástroj vzniku nových fenotypových znaků	12
2.4.1. Změny ve shlukích genů pro biosyntézu antibiotik a vznik nových "supershluků"	13
3. Linkosamidová antibiotika	14
3.1. Linkosamidy a jejich deriváty.....	14
3.2. Struktura a biologická aktivita linkomycinu, celesticetinu a polosyntetického derivátu klindamycinu	14
3.2.1. Chemické modifikace linkomycinu - příprava derivátů s vyšší antimikrobiální aktivitou	16
3.3. Mechanismus působení	16
3.4. Shluk genů pro biosyntézu linkomycinu	17
3.5. Shluk genů pro biosyntézu celesticetinu – porovnání se shlukem pro biosyntézu linkomycinu	18
3.6. Biosyntetická dráha linkomycinu.....	19
3.6.1. Syntéza aminokyselinové části – PPL.....	19
3.6.2. Syntéza aminocukerné části - MTL	19
3.6.3. Kondenzace MTL a PPL, finální modifikace	20
3.7. Biosyntetická dráha celesticetinu – porovnání s dráhou linkomycinu	20

4.	Pyrrolo-1,4-benzodiazepiny	20
4.1.	PBD (anthramycin, sibiromycin, tomaymycin) jsou látky mající ve své struktuře inkorporovaný L-prolinový derivát	20
4.2.	Struktura a biologická aktivita anthramycinu, sibiromycinu a tomaymycinu	21
4.3.	Mechanismus působení	22
4.4.	Genové shluky pro biosyntézu anthramycinu, sibiromycinu a tomaymycinu	22
4.5.	Biosyntetické dráhy anthramycinu, sibiromycinu a tomaymycinu	24
5.	Hormaomycin.....	24
5.1.	Hormaomycin je bakteriální signální molekula s antibiotickými vlastnostmi.....	24
5.2.	Struktura hormaomycinu	25
5.3.	Shluk genů pro biosyntézu hormaomycinu	26
5.4.	Biosyntetická dráha hormaomycinu	26
6.	Geny zúčastněné biosyntézy prekurzorů PPL typu v linkomycinu, anthramycinu, tomaymycinu, sibiromycinu a hormaomycinu.....	27
7.	Propylprolinová dráha	28
8.	Evoluční propojení linkosamidů, PBD a hormaomycinu	32
9.	Závěr.....	33
10.	Seznam použité literatury	34

Abstrakt

Linkosamidy, pyrrolo-1,4-benzodiazepiny (PBD) i hormaomycin jsou biologicky aktivní látky odlišné svou strukturou i mechanismem působení. Linkosamidy linkomycin a klindamycin jsou antibiotika využívaná v klinické a veterinární praxi např. v léčbě anaerobních infekcí. PBD jsou testovány pro svou protinádorovou aktivitu, hormaomycin je bakteriální hormon. Linkomycin má do své struktury začleněn neobvyklý prekurzor, 4-propyl-L-prolin (PPL), vznikající z L-tyrosinu. Hormaomycin i některé PBD (tomaymycin, anthramycin, sibiromycin) mají i přes celkovou strukturní nepodobnost s linkomycinem ve své struktuře integrován prolinový motiv s dvou- nebo tří- uhlíkatým postranním řetězcem, stejného biosyntetického původu jako PPL. V biosyntetických genových shlucích příslušných sekundárních metabolitů lze proto nalézt pět nebo šest ortologních genů kódujících biosyntézu těchto strukturně podobných prekurzorů. Existuje zřetelná evoluční souvislost biosyntézy linkomycinu, hormaomycinu a některých PBD. Není však známo, kde unikátní PPL dráha vznikla, rozvíjela se, jaké existují v přírodě její další modifikace, ani jaké byly cesty přenosu biosyntetických genů mechanismem horizontálního genového přenosu. Odpovědi na tyto otázky jsou významné zejména z pohledu přípravy nových hybridních látek s lepšími bioaktivními účinky.

Klíčová slova

linkosamidy, pyrrolo-1,4-benzodiazepiny, hormaomycin, biosyntetické genové shluky, propylprolinová dráha, evoluční propojení

Abstract

Lincosamides, pyrrolo-1,4-benzodiazepines (PBD) and hormaomycin are biologically active substances differing in their structure and mode of action. Lincosamides lincomycin and clindamycin are clinically used antibiotics, PBD exhibit antitumor activity and hormaomycin is a bacterial hormone. Unusual precursor, 4-propyl-L-proline (PPL) derived from L-tyrosine is incorporated in the lincomycin structure. Surprisingly, structurally and functionally dissimilar hormaomycin and some PBD (tomaymycin, anthramycin, sibiromycin) incorporate L-proline derivative with two- or three- carbon side chain of the same biosynthetic origin. Accordingly, a set of orthologous genes coding for biosynthesis of these structurally similar precursors has been found in appropriate biosynthetic gene clusters. There is a clear evolutionary relationship among the biosynthesis of lincomycin, hormaomycin and some PBD. However, the evolutionary origin of PPL pathway is not known as well as its further development. Only a limited number of naturally occurred modifications of the pathway has been described and the history of supposed horizontal gene transfers of biosynthetic genes remains unknown. Answers to these questions are particularly important due to the preparation of new hybrid substances with improved bioactive effects using methods of genetic engineering.

Keywords

lincosamides, pyrrolo-1,4-benzodiazepines, hormaomycin, biosynthetic gene clusters, propylproline pathway, evolutionary relationship

Seznam použitých zkratek

A-doména	adenylační doména
<i>ccb</i>	gen pro biosyntézu celesticetinu
DOPA	L-3,4-dihydroxyfenylalanin
HGT	horizontální genový přenos
<i>hrm</i>	gen pro biosyntézu hormaomycinu
kbp	kilobase pairs, tedy 10^3 bp (párů bází)
<i>lmb</i>	gen pro biosyntézu linkomycinu
<i>lmr</i>	gen pro rezistenci k linkomycinu
Mbp	megabase pairs, tedy 10^6 bp (párů bází)
MTL	α -methylthiolinkosamid
NDLS	N-demethyllinkomycinsynthetasa
NRPS	neribozomální peptidová synthetasa
<i>orf</i>	gen pro biosyntézu anthramycinu
PBD	pyrrolo-1,4-benzodiazepiny
PPL	4-propyl-L-prolin
<i>sib</i>	gen pro biosyntézu sibiromycinu
<i>tom</i>	gen pro biosyntézu tomaymycinu
[(4-Pe)Pro]	4-(Z)-propenylprolin

1. Úvod

Přírodní antibiotika byla původně definována jako nízkomolekulární organické produkty mikroorganismů, které již v nízkých koncentracích vykazují aktivitu zaměřenou proti jiným druhům mikroorganismů (WAKSMAN 1947). Původní představa byla ale posléze upravena. Mikroorganismy nejsou totiž jedinými producenty antibiotik a jejich účinek není omezen jen na mikroorganismy, ale významná jsou i antibiotika s protinádorovou, imunosupresivní či antiparazitickou aktivitou (DEMAIN 1999). Antibiotická aktivita je cílená a směřuje na potlačení životních procesů v buňce. Výsledným efektem jejich působení je inhibice růstu buňky (bakteriostatický účinek) či indukce buněčné smrti (baktericidní účinek) konkurenčního mikroorganismu (shrnutí v KOHANSKI *et al.* 2010). Antibiotika vznikají v definovaných biosyntetických drahách kondenzací společných meziproductů vznikajících v buňce (např. aminokyseliny, cukry, mastné kyseliny; DEMAIN 1999). Používání velkého množství antibiotik s sebou v posledních třech desetiletích přineslo hrozbu rozšířené bakteriální rezistence. Bakterie se stávají odolnějšími díky změnám v jejich chromozomu a výměnou genetického materiálu pomocí plazmidů, transpozonů a bakteriofágů. Jedním z opatření, které je třeba přijmout za účelem omezení rezistence bakterií, je syntéza látek s vyšší antibakteriální aktivitou (NEU 2013).

Cílem této práce je popsat společné rysy biosyntetických drah odlišných skupin antibiotik produkovaných některými zástupci rodu *Streptomyces* – linkosamidů, pyrrolo-1,4-benzodiazepinů (PBD; anthramycinu, sibiromycinu, tomaymycinu) a unikátního bakteriálního hormonu hormaomycinu. Ačkoliv se tyto látky mezi sebou strukturně liší, všechny mají ve své molekule zabudovaný derivát L-prolinu s různě dlouhým alkylovým bočním řetězcem. Tato stavební jednotka má u všech jmenovaných zástupců stejný biosyntetický původ. Producenti těchto látek tak sdílejí část biosyntetické dráhy, na jejímž konci stojí definovaný prekurzor, který je následně do dané molekuly antibiotika zabudováván. Tato práce se zaměřuje především na geny kódující biosyntézu této stavební jednotky. Charakteristické rysy v genových shlucích pro biosyntézu těchto látek ukazují na společný evoluční původ.

2. Vymezení základních pojmů

2.1. Sekundární metabolismus a charakteristika jeho produktů

Jsou známy taxonomické skupiny mikroorganismů, které jsou vedle biosyntézy esenciálních primárních metabolitů uzpůsobeny k produkci speciálních, takzvaných sekundárních metabolitů. Primární metabolismus zahrnuje sérii propojených specifických kroků, kdy do reakce vstupuje přesně definovaný substrát a vystupuje jasně daný produkt. Chyba v biosyntéze základních buněčných komponent bývá často letální. Produkty primárního metabolismu jsou pro životní pochody v buňce nezbytné a málokdy se hromadí. Jedná se o biosyntézu základních buněčných makromolekul jako deoxyribonukleovou kyselinu, ribonukleovou kyselinu, lipidy, proteiny a polysacharidy. Do sekundárního metabolismu jsou zapojené enzymy s relativně nízkou selektivitou. Případné chyby v biosyntéze nejsou pro buňku letální, většinou na ni nemají žádný vliv a biologická aktivita buňky je nadále zachována. Produkty sekundárního metabolismu se vyznačují velmi rozmanitou chemickou strukturou. Často obsahují i neobvyklé chemické vazby. Sekundární metabolity nejsou na rozdíl od primárních pro buňku esenciální. Jedná se například o antibiotika, pigmenty či toxiny. To, že mikroorganismy vůbec tyto molekuly syntetizují, jim v přirozeném prostředí může poskytovat jistou výhodu. Biologická aktivita těchto látek je velmi široká (CHALLIS a HOPWOOD 2003). Tvorba sekundárních metabolitů většinou začíná na konci růstové fáze, kdy je růst zpomalen v důsledku vyčerpání některého zdroje živin, a dále pokračuje ve fázi stacionární.

2.2. Antibiotika – důležitý sekundární metabolit

Antibiotika jsou přírodní látky produkovány zejména mnoha různými druhy bakterií a hub. Významné jsou pro nás především svým negativním působením na jiné druhy mikroorganismů. Je známo mnoho přirozeně produkováných antibiotik lišících se jak strukturou, tak mechanismem působení. V klinické praxi je však využitelný jen malý zlomek z nich. Je tomu proto, že většina těchto látek je buď toxická pro lidský organizmus, nebo nevykazují dostatečný účinek proti danému patogenu. Mnoho antibiotik vykazuje stejné či velmi podobné účinky. Z těchto se pak využívá jen to s nejlepšími požadovanými

vlastnostmi. Přírodní antibiotika mohou být dále modifikována, čímž je možné získat nové látky s lepšími vlastnostmi (např. silnějším účinkem nebo nižší mírou rezistence).

2.3. Streptomycety jsou významnými producenty antibiotik

Streptomycety se řadí mezi gram-pozitivní bakterie. Jsou to obligátně aerobní mikroorganismy ze třídy *Actinobacteria*, řádu *Actinomycetales* a čeledi *Streptomycetales*. Jejich obvyklým místem výskytu je půda a jiné terestrické ekosystémy, kde celkem snadno přežívají díky své nenáročnosti na zdroje živin. Možnost využívání širokých zdrojů uhlíku, nepotřeba vitamínů a různých růstových faktorů a také charakteristický vláknitý růst (umožňující přežít téměř na jakémkoliv typu substrátu) a životní cyklus zahrnující tvorbu dvou typů mycelií a spor (zaručujících snadné šíření a odolnost vůči extrémním vlivům prostředí), staví streptomycety do pozice významné složky půdního ekosystému. Rozkladem rostlinných i živočišných komponent přispívají ke koloběhu prvků (BENTLEY *et al.* 2002). Kromě degradace organických materiálů jsou streptomycety významnými producenty bioaktivních molekul. Celé dvě třetiny známých sekundárních metabolitů jsou tvořeny zástupci *Actinomycetes* a z toho 70 - 80% rodem *Streptomyces* (CHALLIS a HOPWOOD 2003).

2.3.1. Genom streptomycet odráží produkci sekundárních metabolitů

Chromozom streptomycet odráží složité životní cykly a také tvorbu sekundárních metabolitů, které jsou velmi různorodé (CHEN *et al.* 2002). Streptomycety vlastní lineární chromozom, který je charakteristický vysokým obsahem GC párů (69 - 78 mol. %). Velikost genomu se pohybuje v rozmezí 6 - 9 Mbp. První kompletně osekvenovaný genom byl u zástupce *Streptomyces coelicolor* A3(2) (BENTLEY *et al.* 2002), který má jeden lineární chromozom a dále pak dva plazmidy. Počátek replikace (*oriC*) je umístěn ve středu chromozomu, což naznačuje určitý selektivní tlak. Replikace probíhá obousměrně. Na koncích chromozomu jsou koncové invertované repetice (BENTLEY *et al.* 2002). Pozdější komparativní analýzou *Streptomyces avermitilis* a *Streptomyces coelicolor* bylo zjištěno, že ve střední části jejich chromozomů jsou vysoce konzervované oblasti genů umístěné v podobném pořadí a orientaci. Tato oblast se také ukázala být strukturálně podobná

s jinými cirkulárními bakteriálními chromozomy. Tento genový úsek se zdá být centrálním článkem v chromozomu streptomycet a pravděpodobně se vyvinul z předka společného všem bakteriím, který vlastnil cirkulární chromozom. Naproti tomu, v subtelomerických oblastech se vyskytují méně konzervované oblasti genů. Nachází se zde více než polovina genů spojených se sekundárním metabolismem streptomycet. Dále se v subtelomerických oblastech vyskytují neznámé esenciální geny, mobilní genetické elementy a geny nesouvisející se sekundárním metabolismem. K častým genovým delecím dochází přednostně právě v těchto oblastech. Je tedy zřejmé, že geny sekundárního metabolismu snadno podléhají horizontálnímu přenosu genů zajišťujícího vznik stále nových a unikátních bakteriálních chromozomů (IKEDA *et al.* 2003).

2.4. Horizontální genový přenos jako nástroj vzniku nových fenotypových znaků

Existuje několik způsobů, jak mohou bakterie získávat nové vlastnosti. I v rámci relativně úzké taxonomické skupiny můžeme nalézt pozoruhodně rozmanité fenotypové znaky (OCHMAN *et al.* 2000). Jsou zde dvě hlavní cesty, jak může k této události dojít. Jednou z nich je modifikace stávajících genových sekvencí (intragenové přestavby, mutace). Druhá možnost je horizontálním genovým přenosem (HGT). Tento evoluční jev zajišťuje větší variabilitu genomu a tím umožňuje jedincům získat takové vlastnosti, které jim zpravidla přinášejí výhodu oproti ostatním jedincům stejného druhu. Jde o přenášení různě velké části genetické informace z jednoho organismu (donor) do jiného (akceptor), který není přímým potomkem donorového organismu. Pro úspěšný HGT se musí donorová DNA dostat do recipientní buňky, kde se rekombinuje s hostitelským genomem a tyto rekombinované geny musí být exprimovány stejným způsobem jako geny recipienta. Přenos genetické informace mezi bakteriemi probíhá třemi způsoby: transformací, transdukcí a konjugací. První dva uvedené mechanismy přenosu nevyžadují přímý kontakt donora s recipientem. Konjugace je fyzickým kontaktem podmíněna. Bakteriální genomy jsou díky HGT v neustálém toku a teoreticky každý segment bakteriální DNA může být přenesen. Velikost přenesené DNA často rozhoduje o tom, jak dlouho se nově získaný genový úsek v hostiteli udrží. U relativně dlouhých přenesených sekvencí je riziko rychlé ztráty. Kratší úsek získané DNA může být v genomu udržen po generace (shrnutí v THOMAS a NIELSEN 2005).

2.4.1. Změny ve shlucích genů pro biosyntézu antibiotik a vznik nových "supershluků"

Geny kódující biosyntézu antibiotik jsou téměř vždy seskupeny ve shlucích (FISBACH *et al.* 2006). Tyto shluky jsou asi nejrozmanitější a rychle se vyvíjející genetické elementy. Stavba genového shluku odráží jeho evoluční historii (LAWRENCE 1999). Biosyntetické genové shluky jsou šířeny laterálně pomocí sobeckých genetických elementů jako plazmidy či ostrovy patogenity (SZCZEPANOWSKI *et al.* 2005; HACKER *et al.* 1997). Nové shluky mohou vznikat změnou jednotlivých genů či změnou počtu a identity genů, které tvoří shluk. "Nejjednoduší" změny biosyntetického genového shluku je dosaženo mutací konkrétního genu přímo ve shluku. Zajímavé je slučování zcela odlišných genových "podshluků" kódujících určité funkční části antibiotik v "supershluk". Pro vznik těchto "supershluků" jsou potřeba tzv. konjugační enzymy zajišťující propojení všech produktů jednotlivých podshluků dohromady a fungování nového shluku. Příkladem může být hybridní molekula simocyklinonu, která vzniká díky propojení tří podshluků - chlorobiocinu, aminokumarinu a landomycinu. Slučováním podshluků vznikají nové, strukturálně i chemicky velmi odlišné metabolity (FISBACH *et al.* 2008). Na základě studia genových shluků, které kódují podobné sekundární metabolity u různých druhů bakterií, můžeme do jisté míry vystopovat, odkud byly dané geny přeneseny a kam se dále pravděpodobně šířily.

3. Linkosamidová antibiotika

3.1. Linkosamidy a jejich deriváty

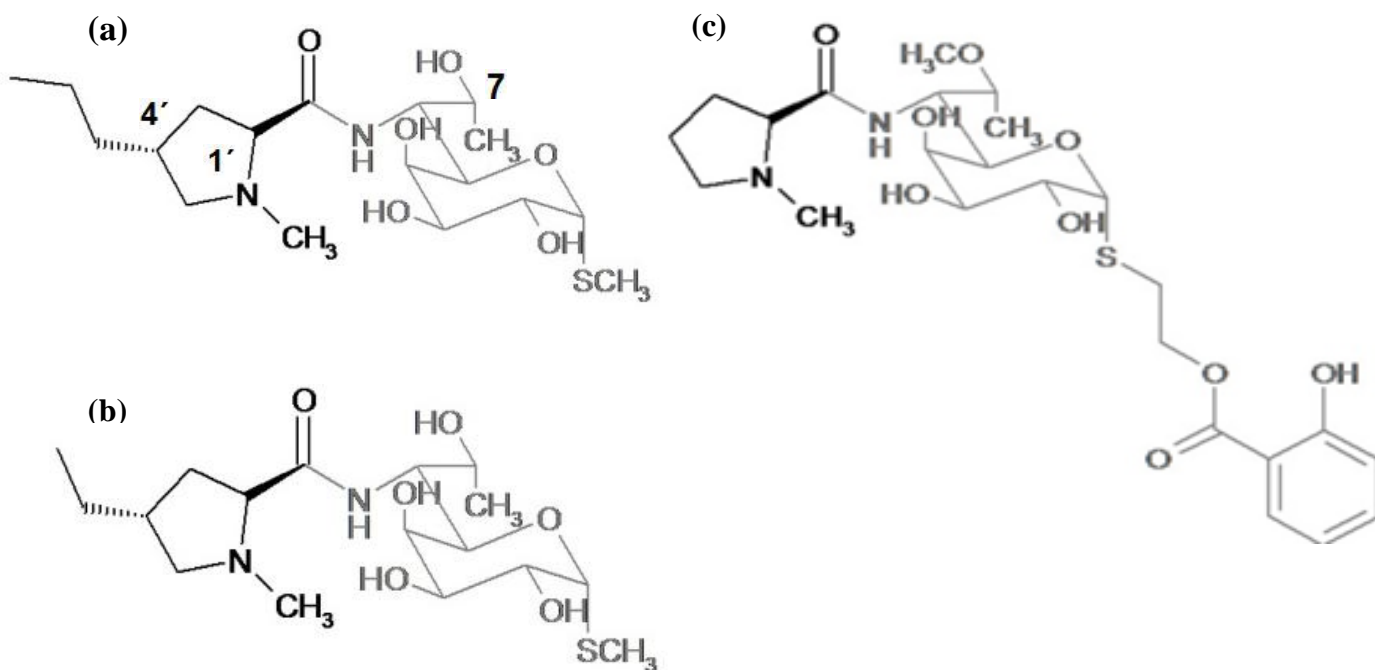
Linkosamidy představují početně malou skupinu antibiotik. Přirozeně jsou produkovány jen několika druhy streptomycet a to především *Streptomyces lincolnensis*, *Streptomyces roseolus* a *Streptomyces caelestis*, a dále také druhem *Micromonospora halophytica*. Přirozeně produkovány linkosamidy jsou jen linkomycin a celesticetin. Druhý jmenovaný, celesticetin, vykazuje jen 5% biologickou aktivitu linkomycinu a v praxi se nevyužívá. Bylo připraveno i několik semisyntetických derivátů linkosamidů, z nichž nejznámější je klindamycin. Klindamycin je v praxi využíván častěji než přirozený linkomycin. Jedná se o chlorovaný derivát linkomycinu, který se vyznačuje vysokou biologickou aktivitou (SPÍŽEK *et al.* 2004).

3.2. Struktura a biologická aktivita linkomycinu, celesticetinu a polosyntetického derivátu klindamycinu

Linkomycin byl prvním členem rodiny linkosamidových antibiotik, jehož struktura byla plně objasněna (HOEKSEMA *et al.* 1964b). Je produkován především druhem *Streptomyces lincolnensis* a dále pak dalšími streptomycetovými druhy. *Streptomyces lincolnensis* produkuje dvě úzce související antibiotika, linkomycin A a linkomycin B. Obě obsahují identickou neobvyklou aminocukernou složku α -methylthiolinkosamid (MTL) a liší se ve druhé části, kterou je aminokyselinová složka. Touto složkou je L-prolinový derivát s dvou- (linkomycin B) či tří- (linkomycin A) uhlíkatým bočním řetězcem v pozici C4' (prekurzor PPL typu), který je dále methylovaný na N1' (BRAHME *et al.* 1984a). Aminokyselinová složka je s MTL spojena amidovou vazbou (Obr. 1a, 1b; HOEKSEMA *et al.* 1964b). Linkomycin B je produkován jako vedlejší produkt linkomycinu A a oproti linkomycinu A vykazuje nízkou biologickou aktivitou (25% aktivity linkomycinu A). Navíc je tvořen ve velmi malém množství (5 – 10% celkového množství linkomycinu A; ARGOUDELIS *et al.* 1965). Linkomycin B není pro řešenou problematiku podstatný, v dalším textu je proto uvažován jen linkomycin A (linkomycin).

Celesticetin byl vůbec prvním objeveným linkosamidem izolovaným v roce 1955. Je produkován bakteriálním druhem *Streptomyces caelestis* (HOEKSEMA *et al.* 1955; DEBOER *et al.* 1955). Studie struktury celesticetinu ukázaly, že je chemicky příbuzný linkomycinu. Obsahuje stejný uhlíkový řetězec, má stejný řád substitucí a stejnou stereochemii. Oproti linkomycinu obsahuje navíc jeden stavební blok, a to salicylát připojený na aminocukr thiocelastosamidin (na C₂ přes thio-skupinu). Aminokyselinovou stavební jednotkou je N-methyl-L-prolin (Obr. 1c; HOEKSEMA 1964a). Ve srovnání s linkomycinem se tedy liší jen ve třech substitučních místech. Jeho antimikrobiální účinky jsou však výrazně menší (MAGERLAIN 1971).

Klindamycin (7-chloro-7-deoxylinkomycin) je polosyntetický derivát linkomycinu. Poprvé byl připraven působením SOCl₂ na směs linkomycinu a HCl za varu v CCl₄. Nahrazení OH skupiny v molekule linkomycinu molekulou chlóru mělo významný vliv na *in vitro* antibakteriální aktivitu molekuly. Vůbec nejsilnější aktivitu vykazuje klindamycin s chlórem v pozici 7(S) a to jak *in vitro*, tak *in vivo*. Zvýšenou antibakteriální aktivitu ve stejném rozsahu jako 7-Cl analog vykazovaly také 7-Br a 7-I analogy (BIRKENMEYER a KAGAN 1970). Ještě lepší účinnost vykazovaly následné deriváty klindamycinu (více kapitola 3.2.1.). Jejich příprava je však velmi složitá, proto se tyto látky průmyslově nevyrábějí.



Obr. 1: Struktura (a) linkomycinu A, (b) linkomycinu B a (c) celesticetinu. Tučně jsou zvýrazněny aminokyselinové stavební jednotky. Převzato z KADLČÍK *et al.* v přípravě.

3.2.1. Chemické modifikace linkomycinu - příprava derivátů s vyšší antimikrobiální aktivitou

Vylepšení vlastností linkomycinu vedlo dvěma směry. První směr je modifikace linkomycinu vedoucí ke zlepšení farmaceutických vlastností jako chuť nebo absorpce. Takto lze připravit různé estery linkomycinu. Druhá cesta vede k syntéze *in vivo* aktivního analogu linkomycinu. Výsledkem takové modifikace má být syntetický linkomycin s rozšířeným antimikrobiálním spektrem, zvýšenou silou účinku či lepší absorpcí. Dlouhá léta studií vedly k přípravě mnoha takovýchto derivátů s různou aktivitou. Tyto analogy obsahují linkomycinovou kostru a dále se liší v jednom nebo více substituentech. Byla testována aktivita látek s modifikovanou aminokyselinovou částí, aminocukernou částí i aktivita látek, které měly modifikované obě jednotky zároveň. Změna substituentů v C7 místě aminocukerné části linkomycinu vedla již ke zmíněnému klindamycinu s vyšší antibiotickou aktivitou než vlastní linkomycin. U připravených derivátů linkomycinu, které měly v pozici C4' aminokyselinové části různě dlouhé alkyly, vykazovaly největší aktivitu deriváty obsahující v tomto místě pentyl či hexyl. Největší aktivity bylo navíc dosaženo v *trans* pozici. Obdobná modifikace klindamycinu, tedy přidání pentylové skupiny na C4' v *trans* pozici, též zvýšila biologickou aktivitu výsledného derivátu. Rozdílných aktivit C4' alkylových derivátů linkomycinu a klindamycinu bylo dosaženo následnou demethylací těchto derivátů na N1'. Zatímco demethylovaný alkylový derivát klindamycinu vykazoval větší aktivitu než původní alkylový derivát (s methylem na N1'), u alkylového derivátu linkomycinu naopak demethylace na N1' vedla k přípravě derivátu s nižší aktivitou. Tato tři kritická místa (C7, C4', N1') jsou pro přípravu linkomycinových derivátů vykazujících lepší vlastnosti rozhodující (MAGERLEIN 1971). Biosyntetickými nástroji tedy můžeme zvyšovat či snižovat biologickou charakteristiku antibiotik, což je základním předpokladem pro přípravu klinicky potřebných substancí.

3.3. Mechanismus působení

Působení linkosamidů je založeno na inhibici mikrobiální syntézy proteinů. Syntéza proteinů zahrnuje několik kroků od aktivace aminokyselinových monomerů aminoacyl-tRNA synthetasou přes iniciaci, elongaci až k terminaci syntézy polypeptidového řetězce na ribozomu. Konkrétní místo působení jsou nukleotidy 23S rRNA 50S podjednotky

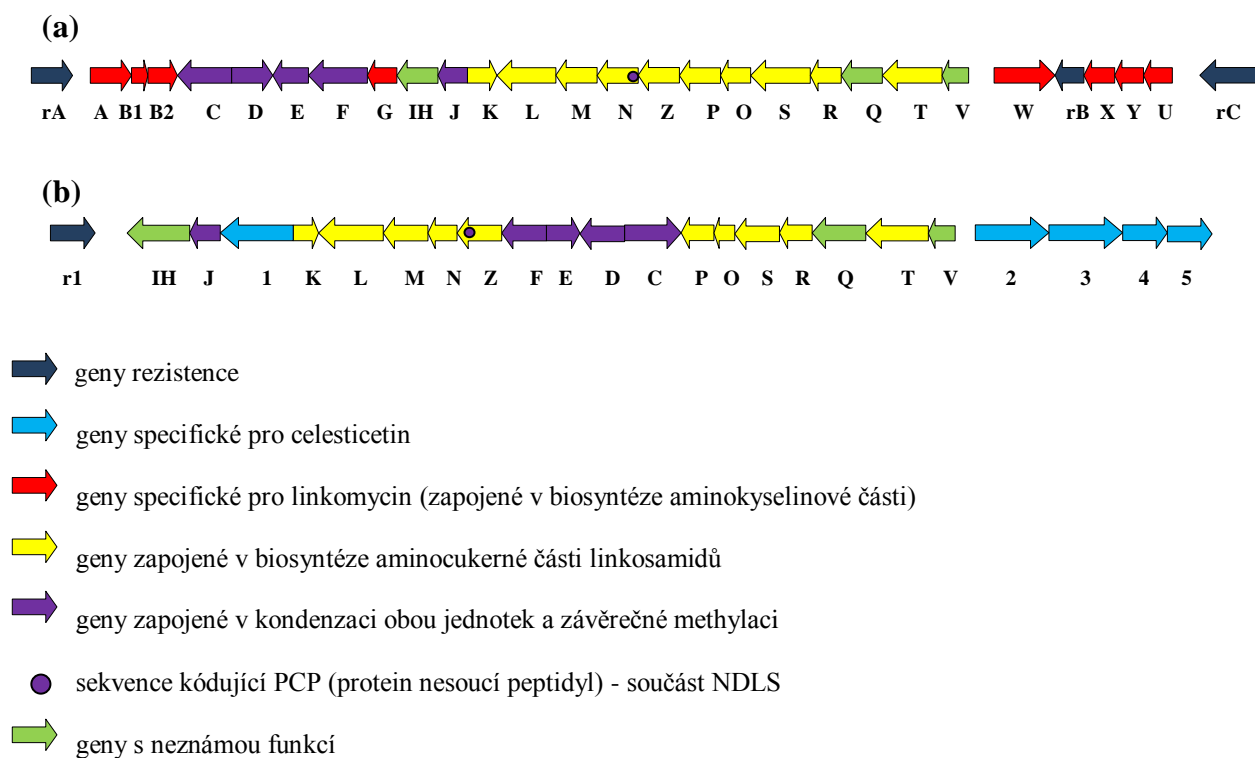
bakteriálního ribozomu (interakce s A a P místem; SCHLÜNZEN *et al.* 2001). Stejným mechanismem účinku se vyznačují i další antibiotika třídy makrolidy-linkosamidy-streptogramin B antibiotika (TENSION *et al.* 2003). Látky z této skupiny antibiotik blokuji protosyntézu v místě, kde nově vznikající proteiny opouštějí ribozom. Účinkují tak, že způsobují disociaci peptidyl-tRNA z ribozomu (SCHLÜNZEN *et al.* 2001).

3.4. Shluk genů pro biosyntézu linkomycinu

Studiemí genového shluku pro biosyntézu linkomycinu založenými na klonování, hybridizaci a sekvenaci přibližně 34 kbp velké oblasti genomové DNA u vysokoprodukčního kmene *Streptomyces lincolnensis* 78-11 byl položen základní koncept o organizaci genů v tomto biosyntetickém shluku. Bylo zjištěno, že se skládá z 30 genů s domnělými biosyntetickými a regulačními funkcemi (*lmb* geny) včetně 3 genů rezistence (*lmr* geny). Tato představa byla uveřejněna v roce 1995 (PESCHKE *et al.* 1995). Výsledky sekvenace genového shluku typového kmene *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466, který na rozdíl od *Streptomyces lincolnensis* 78-11 není šlechtěný, vedly k upřesnění na počet 29 genů, včetně 3 genů rezistence. Velikost shluku odpovídala velikosti asi 32 kbp (KOBĚRSKÁ *et al.* 2008; Obr. 2a). Celý shluk je ohraničen geny *lmrA* a *lmrC*, geny nacházející se mezi těmito geny jsou pro kódování biosyntézy linkomycinu dostačující (KOBĚRSKÁ *et al.* 2008). Existence nevázaných *lmb* genů však nebyla vyloučena (PESCHKE *et al.* 1995; KOBĚRSKÁ *et al.* 2008). Celý shluk tvoří dohromady dvanáct možných transkripčních jednotek (PESCHKE *et al.* 1995). U několika genových produktů bylo již provedeno funkční testování. U většiny genů byla však funkce proteinů, které kódují, jen navržena na základě podobnosti s funkčně známými proteiny (PESCHKE *et al.* 1995; KOBĚRSKÁ *et al.* 2008). Kromě dvou zmíněných genů rezistence (*lmrA*, *C*), které ohraničují celý biosyntetický shluk, se zde nachází ještě třetí gen rezistence - *lmrB*. Dále jsou ve shluku přítomny geny kódující biosyntézu MTL a PPL prekurzorů (geny pro biosyntézu PPL budou dále diskutovány v kapitole 6), geny kódující kondenzační enzym N-demethyllinkomycin synthetasu (NDLS) katalyzující propojení těchto dvou částí (PESCHKE *et al.* 1995, KOBĚRSKÁ *et al.* 2008, KOBĚRSKÁ 2010) a gen *lmbJ*, který kóduje methyltransferasu katalyzující poslední krok biosyntézy linkomycinu (KADLEC 2000). Ve shluku jsou přítomny i geny s prozatím neobjasněnou funkcí (PESCHKE *et al.* 1995, KOBĚRSKÁ *et al.* 2008, KOBĚRSKÁ 2010).

3.5. Shluk genů pro biosyntézu celesticetinu – porovnání se shlukem pro biosyntézu linkomycinu

Genový shluk pro biosyntézu celesticetinu byl objasněn na základě srovnávací analýzy s genovým shlukem pro biosyntézu linkomycinu. Obsahuje 24 hypotetických genů (*ccb* geny), včetně genu rezistence (*ccr* gen) a jeho délka je asi 27 kbp. Celý shluk je ohraničen geny *ccr1* a *ccb5*. Komparativní analýza odhalila, že shluky sdílejí 18 homologních genů kódujících syntézu aminocukerné části a podjednotky kondenzačního enzymu. V genovém shluku pro biosyntézu celesticetinu se dále nacházejí geny kódující syntézu a připojení salicylátové jednotky a jeden gen pro specifickou metylaci. Ve shluku je přítomen jen jeden gen rezistence (*ccr1*), nevyskytují se zde geny homologní genům pro syntézu PPL. Prekurzorem aminokyselinové části celesticetinu je proteinogenní L-prolin, jeho syntéza tedy nevyžaduje další specializované geny (Obr. 2b; KOBĚRSKÁ 2010).



Obr. 2: Schéma genových shluků pro biosyntézu (a) linkomycinu a (b) celesticetinu. Barevně je odlišeno navrhované funkční zapojení jednotlivých genů do biosyntetické dráhy. Převzato a upraveno z KOBĚRSKÁ 2010.

3.6. Biosyntetická dráha linkomycinu

MTL a PPL jsou dvě rozdílné biosyntetické jednotky. Biosyntetická dráha linkomycinu se skládá ze syntézy a aktivace obou prekurzorů, kondenzace obou složek a finální modifikace (PESCHKE *et al.* 1995). Biosyntetická dráha vedoucí k linkomycinu není do dnešního dne podrobně známa a nové studie postupně vedou k objasňování jednotlivých kroků celé biosyntézy.

3.6.1. Syntéza aminokyselinové části – PPL

Aminokyselinová část linkomycinu, N-methyl-4-propyl-L-prolin, vzniká z neobvyklé aminokyseliny, 4-propyl-L-prolinu, syntetizované specifickou dráhou z L-tyrosinu (BRAHME *et al.* 1984a). Analogická biosyntetická dráha přeměňující L-tyrosin na prekurzory PPL typu je kódovaná i v genových shlucích některých PBD (anthramycinu, sibiromycinu, tomaymycinu; HU *et al.* 2007, LI *et al.* 2009a, LI *et al.* 2009b) a hormaomycinu (HÖFER *et al.* 2011). Biosyntetické dráhy vedoucí k těmto prekurzorům PPL typu budou dále diskutovány v kapitole 7.

3.6.2. Syntéza aminocukerné části - MTL

Aminocukernou částí linkomycinu je karbohydrát 6-amino-6,8-dideoxy-1-thio-D-erythro- α -D-galakto-oktopyranosid, pojmenovaný triviálním názvem methylthiolinkosamid (SCHROEDER *et al.* 1967). První pokusy o objasnění původu tohoto aminocukru byly provedeny v roce 1969 (ARGOUDELIS *et al.* 1969). Domnělá biosyntetická dráha vedoucí k MTL byla poprvé navržena v roce 1984 (BRAHME *et al.* 1984b). Geny kódující enzymy zapojené v biosyntéze MTL jsou zřejmě *lmbG*, *K*, *L*, *M*, *N*, *Z*, *P*, *S*, *R* a *T* (PESCHKE *et al.* 1995; KOBĚRSKÁ 2010). Dráha pro biosyntézu MTL zřejmě zahrnuje následující tři klíčové kroky: složení C8 kostry z C3 donorové molekuly (D-sedoheptulosa-7-fosfát či D-fruktosa-6-fosfát) a C5 akceptorové molekuly (D-ribosa-5-fosfát) v transaldolasové reakci katalyzované *LmbR* (SASAKI *et al.* 2012). Dále pravděpodobně konverzi vzniklého oktulosa-8-fosfátu na NDP-aktivovanou oktopyranosu. Posledním krokem je zřejmě modifikace NDP-oktosy na konečný MTL (SPÍŽEK a ŘEZANKA 2004).

3.6.3. Kondenzace MTL a PPL, finální modifikace

Propojení MTL a PPL amidovou vazbou je předposledním krokem biosyntézy linkomycinu. Spojení je zprostředkováno přes karboxylovou skupinu PPL a aminoskupinu MTL za vzniku N-demethyllinkomycinu. Reakce je katalyzována NDLS složenou z několika podjednotek (CHUNG *et al.* 1997). Posledním krokem, jehož výsledkem je linkomycin, je methylace N-demethyllinkomycinu. Tuto reakci zprostředkovává N-demethyllinkomycintransferasa LmbJ (KADLEC 2000).

3.7. Biosyntetická dráha celesticetinu – porovnání s dráhou linkomycinu

Prekurzorem aminokyselinové částí celesticetinu je proteinogenní aminokyselina L-prolin. Její specializovaná syntéza tedy není třeba. Aminocukerná část celesticetinu je syntetizována obdobným způsobem jako u linkomycinu. Biosyntéza další stavební části, salicylátu, zatím nebyla publikována.

4. Pyrrolo-1,4-benzodiazepiny

4.1. PBD (anthramycin, sibiromycin, tomaymycin) jsou látky mající ve své struktuře inkorporovaný L-prolinový derivát

PBD patří do skupiny látek charakterizovaných přítomností 1,4-benzodiazepinového kruhu v molekule. Jsou tvořeny dvěma základními částmi - anthranilátovou a prolinovou podjednotkou. Spojení obou částí zajišťuje peptidová vazba. Následné, pravděpodobně spontánní uzavření do kruhu, dává vznik charakteristickému benzodiazepinovému jádru (HURLEY a ROKEM 1983). Různé modifikace základní struktury PBD, jako odlišné substituenty či saturace vazeb, jsou důsledkem chemické diverzity mezi PBD. Přírodně jsou produkovány především několika druhy streptomycet a mikrokoky. Již bylo připraveno i několik syntetických derivátů. PBD jsou zajímavé nejen pro svoji antibiotickou aktivitu, ale oproti linkosamidům vykazují navíc aktivitou zaměřenou proti nádorovým buňkám. Užití

v klinické praxi je znemožněno jejich kardiotoxicitou. Byly zaznamenány i PBD nevykazující žádnou biologickou aktivitu (GERRATANA *et al.* 2010).

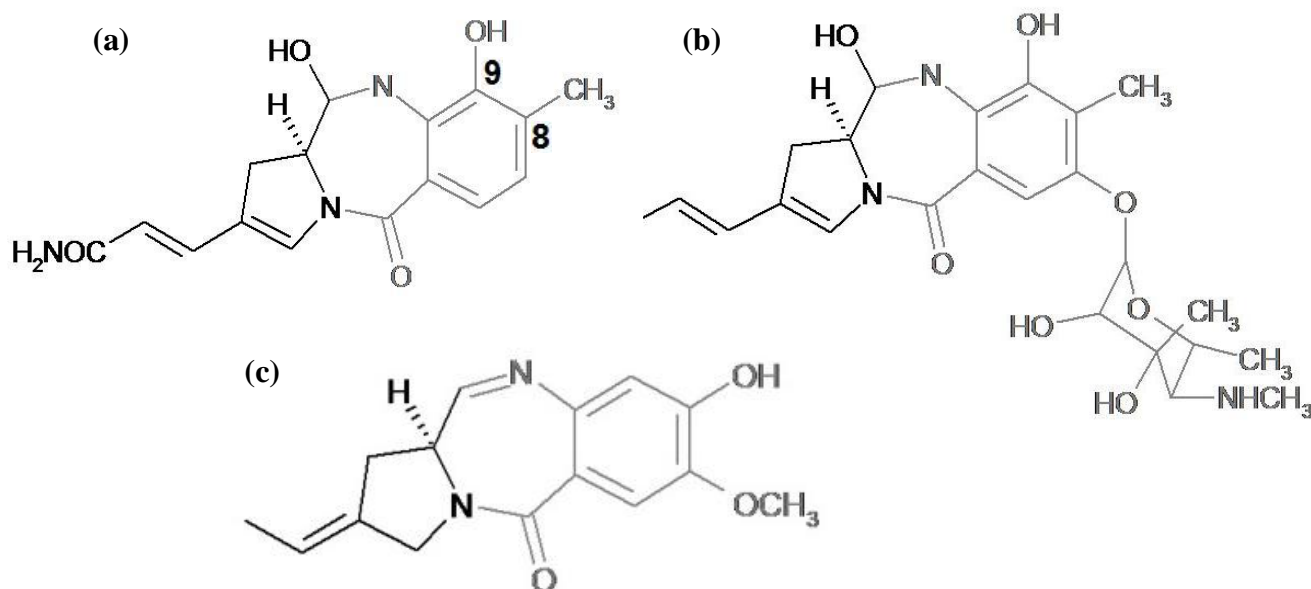
Anthramycin, sibiromycin a tomaymycin jsou zástupci PBD inkorporující do své struktury prekurzor PPL typu, který je pro nás z hlediska evoluce linkomycinu, PBD a hormaomycinu velmi zajímavý. Na základě vědeckých studií se u těchto zástupců PBD podařilo získat cenné informace o biosyntetických genových shlucích i samotné biosyntéze (HU *et al.* 2007, LI *et al.* 2009a, LI *et al.* 2009b). Následující text se zaměřuje výhradně na tyto tři zástupce.

4.2. Struktura a biologická aktivita anthramycinu, sibiromycinu a tomaymycinu

Anthramycin byl prvním objeveným PBD. Je to benzodiazepinový alkaloid vykazující antitumorovou a antibiotickou aktivitu. Je produkován termofilní aktinomycetou *Streptomyces refuineus* (TENDLER a KORMAN 1963). Jeho struktura byla objasněna v roce 1965 (LEIMGRUBER *et al.* 1965; Obr. 3a). Základní části této molekuly jsou 4-methyl-3-hydroxyanthranilová kyselina a dehydroprolinakrylamid.

Sibiromycin je glykosylovaný PBD produkováný aktinomycetou *Streptosporangium sibiricum* (BRAZHNIKOVA *et al.* 1972). S anthramycinem sdílí stejné substituenty, a to hydroxylovou skupinu v pozici C9 a methylovou skupinu v pozici C8. Je tvořen 4-methyl-3,5-hydroxyanthranilovou kyselinou, cukerným substituentem je sibirosamin (6-deoxyhexosa). Prolinovou podjednotkou je propylidendehydroprolin (Obr. 3b).

Tomaymycin je přirozeně produkováný *Streptomyces achromogenes* (ARIMA *et al.* 1972). Jeho molekula je tvořena z 5-methoxy-4-hydroxyanthranilové kyseliny a ethylidenprolinu. Na rozdíl od předchozích dvou zástupců, tomaymycin v pozici C9 substituovaný není (Obr. 3c).



Obr. 3: Struktura (a) anthramycinu, (b) sibiromycinu a (c) tomaymycinu. Tučně jsou zvýrazněny prekurzory PPL typu, které tyto molekuly obsahují. Převzato z KADLČÍK *et al.* v přípravě.

4.3. Mechanismus působení

Všechny PBD interagují s DNA velmi specifickým způsobem. Kovalentně se vážou k molekule DNA. Reaktivním místem na molekule DNA je guanin umístěný v malém žlábků této dvojřetězcové molekuly. Formování komplexu PBD-DNA způsobuje velmi malou distorzi dvojšroubovice, která je špatně rozpoznatelná DNA opravnými proteiny (PETRUSEK *et al.* 1981).

4.4. Genové shluky pro biosyntézu anthramycinu, sibiromycinu a tomaymycinu

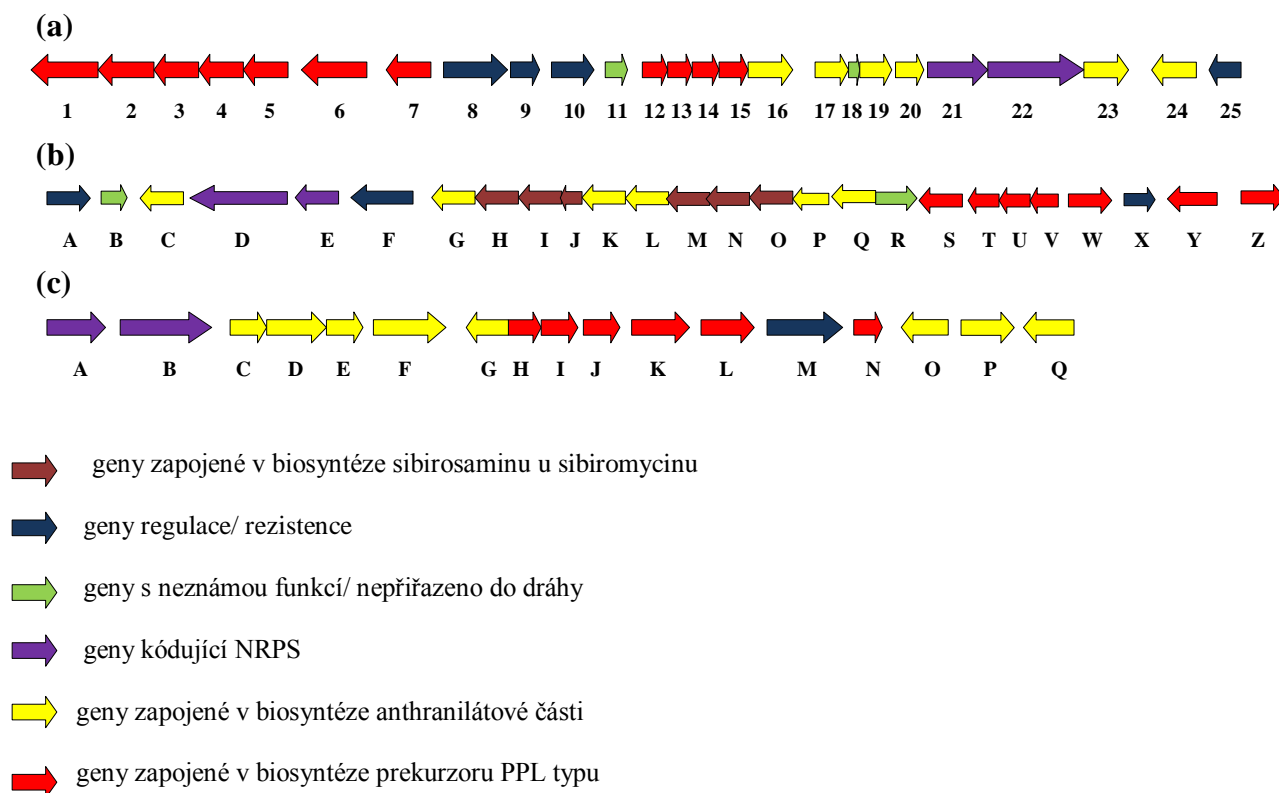
V genových shlucích producentů anthramycinu, sibiromycinu a tomaymycinu jsou přítomny geny kódující biosyntézu dvou základních částí PBD (anthranilátovou a prolinovou část), geny kódující neribozomální peptidovou syntetasu (NRPS), geny rezistence, případně také geny regulační a geny s prozatím neznámou funkcí.

Sekvenací genového shluku pro biosyntézu anthramycinu bylo zjištěno, že shluk je 32,5 kbp velký a obsahuje celkem 25 genů (*orf* geny). Shluk je ohraničen geny *orf1* a *orf25*.

a jsou zde pravděpodobně přítomny tři geny rezistence (*orf8*, 9, 10) a jeden gen regulační (*orf25*; HU *et al.* 2007; Obr. 4a).

Genový shluk pro biosyntézu sibiromycinu byl osekvenován u kmene *Streptosporangium sibiricum* ATCC 29053. Shluk je velký 32,7 kbp a tvoří jej 26 genů (*sib* geny). Shluk ohraničují geny *sibA* a *sibZ*. Sibiromycin na rozdíl od anthramycinu a tomaymycinu dále obsahuje vzácný cukr - sibirosamin, do jehož biosyntézy je zapojeno zřejmě šest genů. U většiny z nich byla nalezena velká podobnost s biochemicky charakterizovanými enzymy. *SibA* a *sibX* jsou pravděpodobně transkripční regulátory. Genem rezistence je zřejmě *sibF*. Ve shluku jsou dále přítomny dva geny, jejichž funkce zůstává neznámá (LI *et al.* 2009a; Obr. 4b).

Genový shluk producenta tomaymycinu je velký 26 kbp a obsahuje 17 genů (*tom* geny). Shluk je ohraničen geny *tomA* a *tomQ*. Vyskytuje se zde jeden gen rezistence (*tomM*). Geny pro regulaci zcela chybí (LI *et al.* 2009b; Obr. 4c).



Obr. 4: Schéma genových shluků pro biosyntézu (a) anthramycinu, (b) sibiromycinu a (c) tomaymycinu. Barevně je odlišeno navrhované funkční zapojení jednotlivých genů do biosyntetické dráhy. Převzato a upraveno z HU *et al.* 2007, LI *et al.* 2009a, LI *et al.* 2009b.

4.5. Biosyntetické dráhy anthramycinu, sibiromycinu a tomaymycinu

Biosyntetické dráhy vedoucí k PBD se podobně jako u linkomycinu skládají z oddělené biosyntézy prekurzorů a jejich následné kondenzace. Zatímco biosyntéza prekurzoru PPL typu je u všech zástupců z větší části analogická, syntéza anthranilátové části se liší v závislosti na tom, zda daný PBD obsahuje C9 substituent (anthramycin, sibiromycin) či ne (tomaymycin). Jako metabolický prekurzor anthranilátové části byl u těchto tří PBD identifikován L-tryptofan (HURLEY *et al.* 1980). U anthramycinu a sibiromycinu je L-tryptofan degradačním procesem formován v 3-hydroxyanthranilovou kyselinu. Biosyntéza anthranilátové části tomaymycinu vede přes intermediáty šikimátové dráhy (konkrétně přes chorismát), které jsou dále přeměňovány anthranilátsynthasou na anthranilovou kyselinu (LI *et al.* 2009b). Prekurzory PPL typu jsou odvozovány obdobně jako u linkomycinu z L-tyrosinu (HURLEY a ZMIJEWSKI 1974, HURLEY 1980) a jejich biosyntéza je shrnuta v kapitole 7.

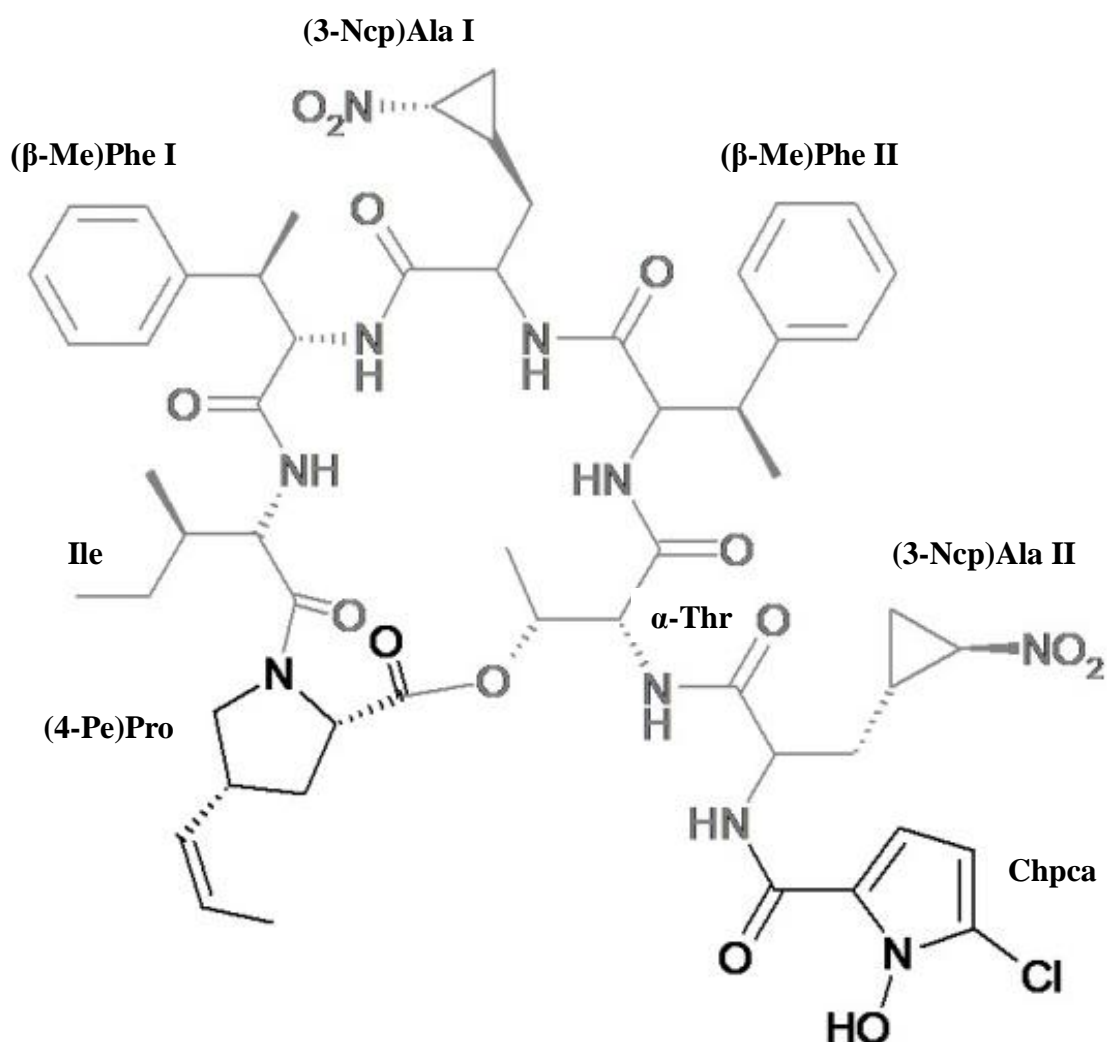
5. Hormaomycin

5.1. Hormaomycin je bakteriální signální molekula s antibiotickými vlastnostmi

Hormaomycin je cyklický depsipeptid obsahující pozoruhodné strukturální znaky. Poprvé byl izolován v roce 1989 z druhu *Streptomyces griseoflavus* (ANDRES *et al.* 1989). V rámci třídy *Actinobacteria* působí jako bakteriální hormon, jehož účinky vyvolávají diferenciaci a produkci sekundárních metabolitů. Také vykazuje extrémně silnou antimikrobiální aktivitu proti koryneformním aktinomycetám (ANDRES *et al.* 1990). Tato látka je pro nás v souvislosti s linkomycinem a PBD zajímavá především jedním svým stavebním blokem. Do své molekuly totiž inkorporuje prekurzor PPL typu, 4-propenylprolin, se stejným biosyntetickým původem jako prekurzory PPL typu v linkomycinu a PBD.

5.2. Struktura hormaomycinu

Hormaomycin je tvořen šesti unikátními stavebními jednotkami. Kromě jednoho zbytku proteinogenní aminokyseliny izoleucinu [(S)-Ile], obsahuje další dvě jednotky 3-(2S,3R)-methylfenylalaninu [(β-Me)Phe], jednu jednotku (2R)-*allo*-threoninu [*α*-Thr], dvě jednotky 3-(1'R,2'R)-(trans-2-nitrocyclopropyl)alaninu [(3-Ncp)Ala], jednu jednotku 4-(Z)-propenylprolinu [(4-Pe)Pro] a boční řetězec je ukončen 5-chloro-1-hydroxypyrrol-2-karboxylovou kyselinou [Chpca] (ANDRES 1990). Struktura hormaomycinu byla potvrzena na základě totální syntézy tohoto metabolitu (ZLATOPOLSKYI a MEIJERE 2004; Obr. 5).



Obr. 5: Unikátní struktura molekuly hormaomycinu. Tučně jsou zvýrazněny L-prolinové deriváty. Převzato a upraveno z KADLČÍK *et al.* v přípravě.

D, E, F, G (HÖFER *et al.* 2011) a jejich předpokládané zapojení do biosyntézy je diskutováno v kapitole 6.

6. Geny zúčastněné biosyntézy prekurzorů PPL typu v linkomycinu, anthramycinu, tomaymycinu, sibiromycinu a hormaomycinu

Jak již bylo zmíněno v předchozích kapitolách, linkomycin, anthramycin, sibiromycin, tomaymycin a hormaomycin sdílejí společný strukturní prvek. Všechny tyto látky do své struktury inkorporují prekurzor PPL typu, který vzniká v různě modifikované PPL dráze kódované v genových shlucích producentů všech diskutovaných látek.

Geny pravděpodobně zapojené v biosyntéze prekurzoru PPL typu linkomycinu (PPL), jsou *lmbA*, *B1*, *B2*, *X*, *Y*, *W* (PESCHKE *et al.* 1995; KOBĚRSKÁ *et al.* 2008). Geny *lmbA*, *B1* a *B2* tvoří společnou transkripční jednotku. Geny *lmbB1* a *B2* kódují enzymy, které katalyzují dva počáteční kroky PPL dráhy (NEUSSER *et al.* 1998). Gen *lmbB2* kóduje L-tyrosin-3-hydroxylasu katalyzující první krok biosyntézy PPL, přeměnu L-tyrosinu na L-DOPA (NOVOTNÁ 2008). Gen *lmbB1* kóduje L-DOPA-2,3-dioxygenasu (NEUSSER *et al.* 1998; NOVOTNÁ *et al.* 2004), řídící následnou reakci, při které je rozštěpen aromatický kruh L-DOPA. Funkce jen těchto dvou proteinů jsou prokázány funkčními testy. Navržená následná hydrolytická funkce proteinu LmbX (LI *et al.* 2009a) naopak funkčními testy prokázána nebyla (JIRÁČKOVÁ 2012). Navrhované funkce zbývajících proteinů LmbA, Y a W a nově navržená funkce LmbX jsou uvedeny v Tab. 1.

Ortologní geny kódující PPL dráhu v linkomycinu byly nalezeny i v biosyntetických genových shlucích PBD (anthramycinu, sibiromycinu, tomaymycinu; HU *et al.* 2007, LI *et al.* 2009a, LI *et al.* 2009b) a hormaomycinu (HÖFER *et al.* 2011). V genových shlucích producentů anthramycinu a sibiromycinu byly nalezeny ortology všech šesti výše uvedených genů (HU *et al.* 2007, LI *et al.* 2009a), v genových shlucích producentů tomaymycinu a hormaomycinu je ortologních genů jen pět (LI *et al.* 2009b, HÖFER *et al.* 2011; viz. Tab. 1).

gen	ortology (identita s geny linkomycinu %)				navrhovaná funkce
	anthramycin	sibiromycin	tomaymycin	hormaomycin	
lmbA	orf6 (75%)	sibY (58%)	tomL (60%)	hrmG (65%)	γ -glutamyltransferasa
lmbB1	orf12 (49%)	sibV (57%)	tomH (59%)	hrmF (56%)	L-DOPA-2,3-dioxygenasa
lmbB2	orf13 (41%)	sibU (45%)	tomI (42%)	hrmE (48%)	L-tyrosin-3-hydroxylasa
lmbW	orf5 (78%)	sibZ (62%)		hrmC (56%)	methyltransferasa
lmbX	orf15 (35%)	sibS (45%)	tomK (48%)		isomerasa
lmbY	orf14 (52%)	sibT (56%)	tomJ (55%)	hrmD (48%)	F420 dependentní reduktasa; monooxygenasa

Tab. 1: Ortology genů zapojených do biosyntézy prekurzorů PPL typu linkomycinu, anthramycinu, sibiromycinu, tomaymycinu, hormaomycinu a jejich předpokládané funkce. Převzato z JIRÁČKOVÁ 2012.

7. Propylprolinová dráha

V experimentu provedeném s radioaktivně označenými L-[U-14C]tyrosinem a L-[15N]tyrosinem bylo zjištěno, že dusík a sedm z devíti atomů uhlíku tyrosinu byly začleněny do aminokyselinové části linkomycinu (WITZ *et al.* 1971). Stejný biosyntetický původ byl prokázán i u prekurzorů PPL typu v PBD (anthramycinu, sibiromycinu, tomaymycinu; HURLEY a ZMIJEWSKI 1974, HURLEY 1980) a hormaomycinu (HÖFER *et al.* 2011). Stejně tak donor terminální methylové skupiny bočního řetězce prekurzorů PPL typu je stejný. Je to L-methionin (ARGOUDELIS *et al.* 1969, HURLEY 1980, HÖFER *et al.* 2011).

PPL dráha byla poprvé navržena v roce 1984 (BRAHME *et al.* 1984a; Obr. 7).

1. Prvním krokem této dráhy je reakce přeměnění L-tyrosinu na L-DOPA. Tato reakce je katalyzována hydroxylasou - LmbB2 (NOVOTNÁ 2008)

- ORF13 (HU *et al.* 2007)
- SibU (LI *et al.* 2009a)
- TomP (LI *et al.* 2009b)
- HrmE (HÖFER *et al.* 2011).

2. Následuje 2,3-extradiolové štěpení aromatického kruhu L-DOPA a kondenzace do formy pětičlenného pyrrolového kruhu obsahujícího jeden atom dusíku. Vzniká 4-(3-karboxy-3-oxo-propenyl)-2,3-dihydro-1H-pyrrol-2-karboxylová kyselina. Reakce je katalyzovaná L-DOPA-2,3-dioxygenasou - LmbB1 (NEUSSER *et al.* 1998, NOVOTNÁ *et al.* 2004)

- ORF12 (HU *et al.* 2007)
- SibV (LI *et al.* 2009a)
- TomH (LI *et al.* 2009b)
- HrmF (HÖFFER *et al.* 2011).

3. V navrženém schématu by dráha měla pokračovat hydrolýzou C-C vazby a ztrátou dvou atomů uhlíku z bočního řetězce katalyzovaná - LmbX (LI *et al.* 2009a)

- ORF15 (HU *et al.* 2007)
- SibS (LI *et al.* 2009a)
- TomK (LI *et al.* 2009b).

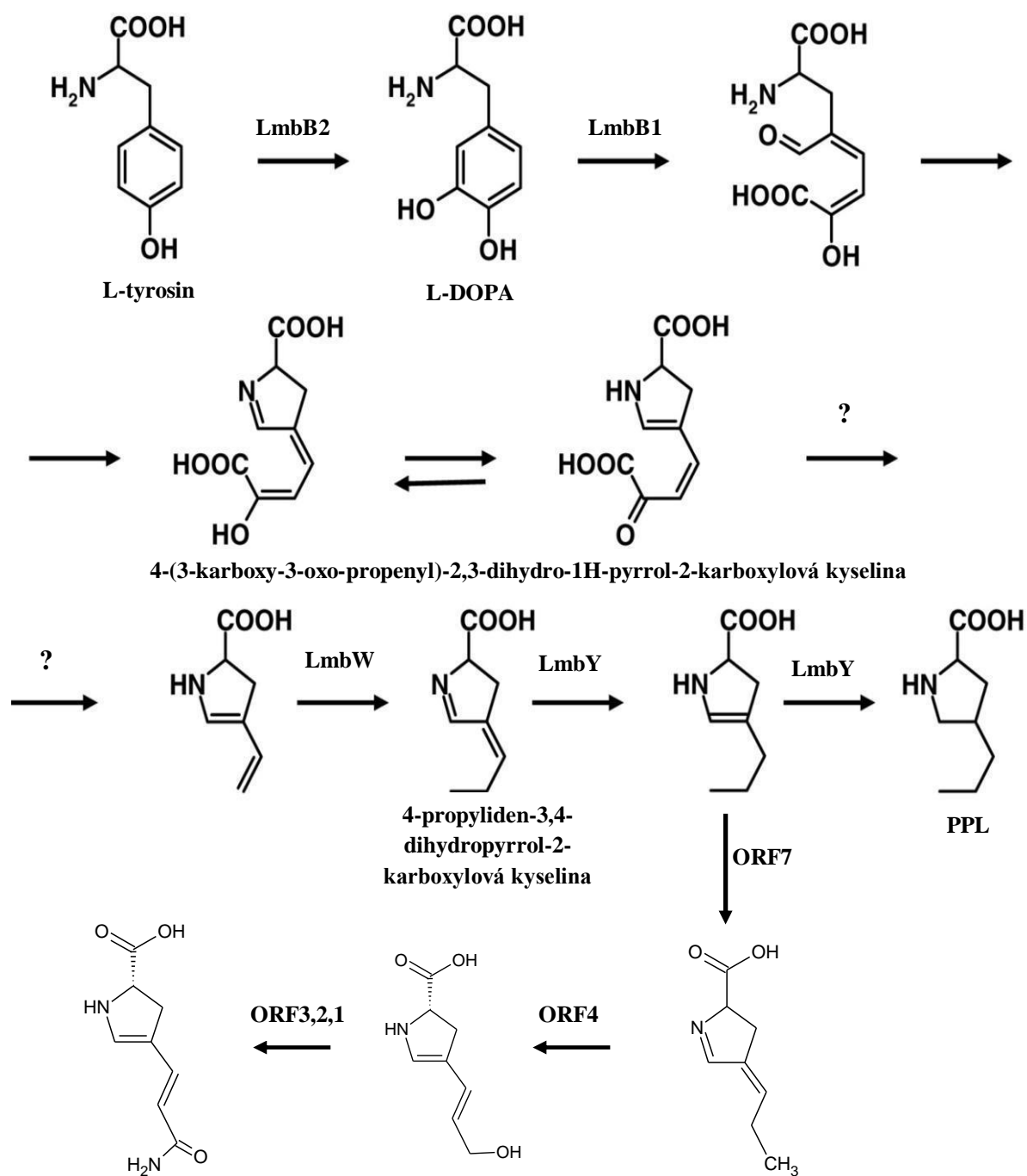
Funkční testování proteinu LmbX (JIRÁČKOVÁ 2012) však neprokázalo jeho navrhovanou hydrolytickou funkci (LI *et al.* 2009a). Na základě tohoto zjištění bylo doposud přijímané schéma PPL dráhy zpochybněno a LmbX byl nově navržen jako isomerasa, katalyzující jiný krok dráhy (JIRÁČKOVÁ 2012). Další indicií o tom, že LmbX nekatalyzuje hydrolýzu C-C vazby, je struktura 4-propenylprolinu, prekursoru PPL typu hormaomycinu. Jeho genový shluk totiž ortolog genu *lmbX* neobsahuje. 4-propenylprolin se však od PPL liší pouze jednou dvojnou vazbou (HÖFFER *et al.* 2011). Jestliže LmbX nekatalyzuje hydrolýzu C-C vazby a funkce enzymů kódovaných geny *lmbB2* a *B1* jsou již prokázány (NOVOTNÁ 2008; NEUSSER *et al.* 1998, NOVOTNÁ *et al.* 2004), otázkou je, který ze tří zbývajících genů (*lmbA*, *W*, *Y*) tedy kóduje enzym přeměňující substrát vzniklý ve druhém kroku dráhy, 4-(3-karboxy-3-oxo-propenyl)-2,3-dihydro-1H-pyrrol-2-karboxylovou kyselinu.

Experimenty s mutanty v genu *LmbW* nasvědčují tomu, že enzym *LmbW* má skutečně methyltransferasovou aktivitu (JIRÁČKOVÁ 2012), která byla pro tento protein navržena (PESCHKE *et al.* 1995). Dle původního schématu měl katalyzovat reakci následující po hydrolytickém štěpení bočního řetězce. Methyltransferasová aktivita *LmbW* je podporována i dosavadními výsledky naší laboratoře (nepublikované). Ortology tohoto genu byly nalezný i v genových shlucích producentů anthramycinu, sibiromycinu

a hormaomycinu (*orf5*, *sibZ*, *hrmC*; HU *et al.* 2007, LI *et al.* 2009a, HÖFFER *et al.* 2011). U tomaymycinu se gen kódující tuto methyltransferasu nevyskytuje. Jeho boční řetězec není propyliden, ale kratší ethyliden. To odpovídá hypotéze, že LmbW je skutečně methyltransferasa.

Enzym LmbA je pravděpodobně γ -glutamyltransferasa (PESCHKE *et al.* 1995). V původní představě připojuje glutamátové zbytky ke kofaktoru F420, který je důležitý pro následnou redukci. Ortology tohoto genu jsou přítomné i v genových shlucích všech diskutovaných producentů (*orf6*, *sibY*, *tom6*, *hrmG*; HU *et al.* 2007, LI *et al.* 2009a, LI *et al.* 2009b, HÖFFER *et al.* 2011). Dnešní představa o funkci LmbA je zatím nejasná, ale zdá se, že glutamátové zbytky ke kofaktoru F420 nepřipojuje (JIRÁČKOVÁ 2012).

Enzym LmbY má sekvenční podobnost s reduktasami, které pro svou aktivitu potřebují kofaktor F420. Bylo prokázáno, že F420 je nezbytný pro syntézu PPL. Pokud chybí, tak se produkuje intermediát dráhy s dvěma dvojnými vazbami (4-propyliden-3,4-dihydropyrrol-2-karboxylová kyselina, KUO *et al.* 1992). LmbY by měl dle navrženého schématu katalyzovat poslední krok dráhy, dvojitou redukci vedoucí ke konečnému produktu, PPL (LI *et al.* 2009a). Není ale vyloučeno, že právě LmbY vykazuje kromě této aktivity ještě další, neprokázanou, monooxygenasovou aktivitu. I ortology tohoto genu byly nalezeny v genových shlucích všech diskutovaných producentů PBD a hormaomycinu (*orf14*, *sibT*, *tomJ*, *hrmD*; HU *et al.* 2007, LI *et al.* 2009a, LI *et al.* 2009, HÖFER *et al.* 2011). Nicméně reakce, které katalyzují, se do určité míry odlišují. U prekursorů tomaymycinu a hormaomycinu je pravděpodobně posledním krokem redukce jen jedné dvojně vazby. Stejná redukce jedné dvojně vazby nastává i u prekursorů sibiromycinu a anthramycinu, biosyntetická dráha těchto dvou prekursorů dále pokračuje oxidací katalyzovanou ORF7, SibW (HU *et al.* 2007, LI *et al.* 2009a). Tímto krokem vzniká konečný prekursor sibiromycinu. Prekursor anthramycinu vstupuje ještě do dalších reakcí (viz. Obr. 7), kdy je nejprve imin tautomerizován na dienamin. Zdá se, že právě imin je vhodný substrát reakce katalyzované ORF4 (zřejmě P450 hydroxylasa). ORF4 se nachází ve shluku mezi enzymy kódovanými geny *orf1*, 2, 3, jejichž proteinové produkty vykazují velkou sekvenční podobnost k alkoholdehydrogenase, aldehyddehydrogenase a aminotransferase. Tyto proteiny zřejmě katalyzují poslední tři reakce vedoucí ke konečnému prekursoru PPL typu anthramycinu. Tedy oxidaci na aldehyd, následně na karboxylovou kyselinu a závěrečnou aminaci na akrylamid (HU *et al.* 2007).



Obr. 7: Schéma PPL dráhy. Poslední řádek ukazuje dokončení biosyntézy prekursoru anthramycinu. Pojmenované jsou prokázané intermediáty dráhy. Převzato a upraveno z NOVOTNÁ 2008, HU *et al.* 2007.

8. Evoluční propojení linkosamidů, PBD a hormaomycinu

Nalezené ortology genů kódujících biosyntézu prekurzorů PPL typu v linkomycinu, PBD (anthramycinu, sibiromycinu, tomaymycinu) a hormaomycinu ukazují na možný genetický překryv biosyntetických genových shluků producentů těchto látek. Zřejmě došlo k částečné fúzi, kdy skupina šesti genů kódujících PPL dráhu v genovém shluku producenta PBD inkorporujícího do své struktury neobvyklý prekurzor PPL typu, byla začleněna do genového shluku producenta původního linkosamidu inkorporujícího do své struktury konzervativní prolin (jako je tomu dnes u celesticetinu). Výsledkem byl vznik biosyntetického genového shluku linkomycinu. V genovém shluku pro biosyntézu hormaomycinu chybí ortolog *lmbX*. Pravděpodobně tedy i producent hormaomycinu přijal geny kódující PPL dráhu od producenta PBD, nikoliv naopak.

Propojení aminokyselinové a aminocukerné části linkomycinu zajišťuje kondenzační enzym NDLS. Předpokládá se, že protein LmbC je aminokyselinová adenylační doména (A-doména) tohoto enzymu (PESCHKE 1995) a má klíčovou roli při výběru substrátu do kondenzační reakce. Protějšek tohoto proteinu je kódován i celesticetinovým biosyntetickým genovým shlukem (CcbC; KOBĚRSKÁ 2010). A-doména kondenzačního enzymu účastnícího se biosyntézy původního linkosamidu inkorporujícího do své struktury prolin (modelem je CcbC), rozpoznává jako substrát pouze prolin. Úzká specifita vazebného místa nedovoluje přijmout substráty s většími prostorovými nároky, jakým je PPL či jeho deriváty s delšími bočními řetězci. Substrátová specifita původního kondenzačního enzymu byla tedy posunuta z konzerovaného substrátu L-prolinu na neobvyklý substrát PPL, a to několika bodovými mutacemi přímo ve vazebném místě substrátu (vazebné místo LmbC a CcbC se liší jen v pěti aminokyselinách) a zároveň musela být radikálně snížena afinita k původnímu substrátu, L-prolinu (KADLČÍK *et al.* v přípravě).

Z pohledu evoluce biosyntetického genového shluku linkomycinu je také zajímavý produkt genu *lmbJ*, který katalyzuje závěrečný krok biosyntézy linkomycinu, metylaci N-demethyllinkomycinu (KADLEC 2000). Homolog tohoto genu je přítomen i v biosyntetickém genovém shluku celesticetinu (*ccbJ*, KOBĚRSKÁ 2008). Je zajímavé, že v tomto případě (LmbJ/CcbJ) nemuselo dojít k podstatné změně substrátové specifity, jako u enzymů LmbC/CcbC. CcbJ je schopný přeměny N-demethyllinkomycinu, pro tento enzym nepřírodního substrátu, skoro stejně účinně jako LmbJ v biosyntéze linkomycinu. Podobně, LmbJ je schopný katalyzovat reakci přeměny substrátů s delším bočním řetězcem než má jeho

přirozený substrát N-demethyllinkomycin (NAJMANOVÁ *et al.* v přípravě). Těto uvolněné substrátové specifity enzymů LmbJ/CcbJ by se dalo využít k přípravě účinnějších derivátů linkosamidů.

9. Závěr

Inkorporace prekurzoru PPL typu stejného biosyntetického původu do své struktury je znak, který spojuje tři strukturně velmi rozdílné skupiny biologicky aktivních látek: linkomycin, PBD (anthramycin, sibiromycin, tomaymycin) a hormaomycin. Tyto látky tak sdílejí část biosyntetické dráhy. To, že producenti těchto látek sdílejí ve svých biosyntetických genových shlucích ortologní geny, ukazuje na evoluční propojení těchto látek.

Antimikrobiální rezistence se stává globálním problémem. Nevhodné a iracionální používání antibiotik poskytuje příznivé podmínky pro šíření genů rezistence mezi bakteriemi. Léčení infekcí způsobených rezistentními kmeny bakterií je pak obtížnější, mnohem delší a s vyšším rizikem úmrtí. V roce 2011 dokonce WHO (Světová zdravotnická organizace) zvolila problematiku šíření antibiotické rezistence jako téma Světového dne zdraví (World Health Day 2011 – "Antimicrobial resistance: no action today, no cure tomorrow"). Příprava antibiotik s rozšířenou antimikrobiální aktivitou, vůči které by prozatím neexistovala rezistence, je možnou strategií v boji s bakteriálními infekcemi, které na standardně užívaná léčiva nereagují. Doposud získané informace o PPL dráze kódované v jednotlivých biosyntetických genových shlucích producentů linkomycinu, PBD (anthramycinu, sibiromycinu, tomaymycinu) a hormaomycinu však zatím nejsou na takové úrovni, aby se mohly tyto poznatky cíleně uplatnit v praktických oblastech vědy jako je například příprava hybridních antibiotik s novou, rozšířenou aktivitou. Malým, ale ne nevýznamným krokem k tomuto velkému cíli je funkční potvrzení enzymu kódovaného genem *lmbW*, který je domnělou methyltransferasou. Toto funkční prokázání bude hlavním tématem mé diplomové práce v rámci magisterského studia. Cílem je připravit expresní vektor, který bude mít do své sekvence vložen zmíněný gen *lmbW*. Nadprodukce proteinu LmbW a jeho reakce s předpokládaným substrátem dráhy by pak měla potvrdit či vyvrátit jeho navrženou funkci.

10. Seznam použité literatury

- Andres, N., Wolf, H., Zähler, H., Rössner, E., Zeeck, A., König, W. A., Sinnwell, V. (1989). Citováno podle Höfer, I., Crüsemann, M., Radzom, M., Geers, B., Flachshaar, D., Cai, X., Zeeck, A., Piel, J. (2011): Hormaomycin, a novel peptide lactone with morphogenetic activity on *Streptomyces*. *Helvetica Chimica Acta* 72(3): 426-437.
- Andres, N., Wolf, H., Zahner, H. (1990). Citováno podle Höfer, I., Crüsemann, M., Radzom, M., Geers, B., Flachshaar, D., Cai, X., Zeeck, A., Piel, J. (2011): Hormaomycin, a new peptide lactone antibiotic effective in inducing cytodifferentiation and antibiotic biosynthesis in some *Streptomyces* species. *Zeitschrift für Naturforschung C - A Journal of Biosciences* 45(7-8): 850-855.
- Argoudelis, A. D., Fox, J. A., Eble, T. E. (1965): U-21,669: A new lincomycin-related antibiotic. *Biochemistry* 4(4): 698-703.
- Argoudelis, A. D., Eble, T. E., Fox, J. A., Mason, D. J. (1969): Studies on biosynthesis of lincomycin. IV. The origin of methyl groups. *Biochemistry* 8(8): 3408-3411.
- Arima, K., Kohsaka, M., Tamura, G., Sasaki, H., Imanaka, H. (1972): Studies on Tomaymycin, a New Antibiotic. I. Isolatin and Properties of Tomaymycin. *The Journal of Antibiotics* 25 (8): 437-444.
- Bentley, R., Bennett, J. W. (2003): What Is an Antibiotic? Revisited. *Advances in Applied Microbiology* 52: 303-331.
- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeño-Tárraga, A., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C. W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C. H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M. A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B. G., Parkhill, J., Hopwood, D. A. (2002): Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417(6885): 141-147.
- Birkenmeyer, R., Kagan, F. (1970): Lincomycin. XI. Synthesis and structure of clindamycin. A potent antibacterial agent. *Journal of Medicinal Chemistry* 13(4): 616-619.
- Brahme, N. M. *et al.* (1984a): Biosynthesis of the Lincomycins. 1. Studies Using Stable Isotopes on the Biosynthesis of the Propyl-L-hygric and Ethyl-L-hygric Acid Moieties of Lincomycin A and B. *Journal of the American Chemical Society* 106 (25): 7873-7878.
- Brahme, N. M. *et al.* (1984b): Biosynthesis of the Lincomycins. 2. Studies Using Stable Isotopes on the Biosynthesis of Methylthiolincosaminide Moiety of Lincomycin A. *Journal of the American Chemical Society* 106 (25): 7878-7883.
- Brandl, M., Kozhushkov, S. I., Zlatoposkiy, B. D., Alvermann, P., Geers, B., Zeeck, A., de Meijere, A. (2004): The biosynthesis of 3-(trans-2-nitrocyclopropyl)alanine, a constituent of the signal metabolite hormaomycin. *European Journal of Organic Chemistry* 1: 123-135.
- Brazhnikova, M., Konstantinova, N., Mesentev, A. (1972): Sibiromycin: Isolation and Characterization. *The Journal of Antibiotics* 25 (11): 668-673.

- DeBoer, C., *et al.* (1955): Celesticetin – a new crystalline antibiotic. I. Biological studies of celesticetin. *Antibiotics annual* 2: 831-836.
- Demain, A. L. (1999): Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Applied mikrobiology and biotechnology* 52(4): 455-463.
- Fischbach, M. A., Walsh, C. T. (2006): Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal Peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. *Chemical Reviews* 106(8): 3468-3496.
- Fischbach, M. A., Walsh, C. T., Clardy, J. (2008): The evolution of gene collectives: how natural selection drives chemical innovation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(12): 4601-4608.
- Gerratana, B. (2012): Biosynthesis, synthesis, and biological activities of pyrrolobenzodiazepines. *Medicinal Research Reviews* 32(2): 254-293
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Muhldorfer, I., Tschape, H. (1997): Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Molecular Microbiology* 23(6): 1089-1097.
- Hoeksema, H., Crum, G. F., Devries, W. H. (1955): Isolation and purification of celesticetin. *Antibiotics annual* 2: 837-841.
- Hoeksema, H. (1964a): Celesticetin. IV. The Structure of Celesticetin. *Journal of the American Chemical Society* 86(19): 4224-4225.
- Hoeksema, H., Magerlein, B. J., Kagan, F., Herr, R. R., Slomp, G., Birkenmeyer, R. D., Bannister, B., Schroeder, W., Mackellar, F. A. (1964b): Chemical studies on lincomycin. I. The Structure of Lincomycin. *Journal of the American Chemical Society* 86(19): 4223-4224.
- Hoeksema, H. (1968): Celesticetin. V. Structure of celesticetin. *Journal of the American Chemical Society* 90(3): 755-757.
- Höfer, I., Crüsemann, M., Radzom, M., Geers, B., Flachshaar, D., Cai, X., Zeeck, A., Piel, J. (2011): Insights into the biosynthesis of hormaomycin, an exceptionally complex bacterial signaling metabolite. *Chemistry & Biology* 18(3): 381-391.
- Hu, Y., Phelan, V., Ntai, I., Farnet, C. M., Zazopoulos, E., Bachmann, B. O. (2007): Benzodiazepine biosynthesis in *Streptomyces refuineus*. *Chemistry & Biology* 14(6): 691-701.
- Hurley, L. H., Zmijewski, M. (1974): Biosynthesis of the Antitumor Antibiotic Anthramycin by *Streptomyces refuines*. *Journal of the Chemical Society - Chemical Communications* 9: 337-338.
- Hurley, L. H. (1980): Elucidation and Formulation of Novel Biosynthetic Pathways Leading to the Pyrrolo[1,4]benzodiazepine Antibiotics Anthramycin, Tomaymycin, and Sibiromycin. *Accounts of Chemical Research* 13(8): 263-269.
- Hurley, L. H., Rokem, J. S. (1983): Some insights into the possible development of a biosynthetic pathway and biological function for anthramycin in *Streptomyces refuineus*. *Folia Microbiologica* 28(3): 229-236.
- Challis, G. L., Hopwood, D. A. (2003): Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(2): 14555-14561.

Chen, C. W., Huang, C. H., Lee, H. H., Tsai, H. H., Kirby, R. (2002): Once the circle has been broken: dynamics and evolution of *Streptomyces* chromosomes. *Trends in Genetics* 18(10): 522-529.

Chung S. T., Manis J. J., McWethy J., Patt T. E., Witz D. F., Wolf H. J., Wovcha, M. G.. *Biotechnology of Antibiotics*. Second edition. New York: Marcel Dekker (1997): Fermentation, Biosynthesis and Molecular Genetics of Lincomycin.

Ikeda H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M., Omura, S. (2003): Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature Biotechnology* 21(5): 526-531.

Jiráčková, P. (2012): Příprava a charakterizace proteinu LmbX zúčastněného v biosyntéze antibiotika linkomycinu. Přírodovědecké fakulta, Katedra genetiky a mikrobiologie. Praha, Univerzita Karlova v Praze. Diplomová práce.

Kadlčík, S. *et al.* (v přípravě): Adaption of L-proline adenylation domain to rare substrate 4-propyl-L-proline in evolution of lincosamide antibiotics.

Kadlec, J. (2000): Závěrečný krok biosyntézy linkomycinu. Přírodovědecká fakulta, Katedra genetiky a mikrobiologie. Praha, Univerzita Karlova v Praze. Diplomová práce.

Koběrská, M., Kopecký, J., Olšovská, J., Jelinková, M., Ulanová, D., Man, P., Flieger, M., Janata, J. (2008): Sequence Analysis and Heterologous Expression of the Lincomycin Biosynthetic Cluster of the Type Strain *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466. *Folia Microbiologica* 53(5): 395-401.

Koběrská, M. (2010): Komparativní analýza shluků genů pro biosyntézu linkomycinu a celesticetinu. Přírodovědecká fakulta, Katedra genetiky a mikrobiologie. Praha, Univerzita Karlova v Praze. Dizertační práce.

Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Collins, J. J. (2010): How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology* 8(6): 423-435.

Kuo, M. S., Yurek, D. A., Coats, J. H., Chung, S. T., Li, G. P. (1992): Isolation and identification of 3-propylidene- Δ^1 -pyrroline-5-carboxylic acid, a biosynthetic precursor of lincomycin. *Journal of Antibiotics* 45(11): 1773-1777.

Lawrence, J. G. (1999): Gene transfer, speciation, and the evolution of bacterial genomes. *Current Opinion in Microbiology* 2(5): 519-523.

Leimgruber, W., Batcho, A. D., Schenker, F. (1965): The structure of anthramycin. *Journal of the American Chemical Society* 87(24): 5793-5795.

Li, W., Khullar, A., Chou, S., Sacramo, A., Gerratana, B. (2009a): Biosynthesis of sibiromycin, a potent antitumor antibiotic. *Applied and Environmental Microbiology* 75(9): 2869-2878.

Li, W., Chou, S. C., Khullar, A., Gerratana, B. (2009b): Cloning and characterization of the biosynthetic gene cluster for tomaymycin, an SJG-136 monomeric analog. *Applied and Environmental Microbiology* 75(9): 2958-2963.

Magerlein, B. J., Birkenmeyer, R. D., Herr, R. R., Kagan, F. (1967): Lincomycin. V. Amino Acid Fragment. *Journal of the American Chemical Society* 89(10): 2459-2464.

Magerlein, B. J. (1971): Modification of lincomycin. *Advances of Applied Microbiology* 14: 185-229.

Najmanová, L. *et al.* (v přípravě): Characterization of N-demethyl lincosamide methyltransferases LmbJ and CcbJ.

Neu, H. C. (2013): The crisis in antibiotic resistance. *Science* 257(5073): 1064-1073.

Neusser, D., Schmidt, H., Spížek, J., Novotná, J., Peschke, U., Kaschabeck, S., Tichý, P., Piepersberg, W. (1998): The genes *lmbB1* and *lmbB2* of *Streptomyces lincolnensis* encode enzymes involved in the conversion of L-tyrosine to propylproline during the biosynthesis of the antibiotic lincomycin A. *Archives of Microbiology* 169(4): 322-332.

Novotná, J., Honzátko, A., Bednář, P., Kopecký, J., Janata, J., Spížek, J. (2004): L-3,4-dihydroxyphenyl alanine-extradiol cleavage is followed by intramolecular cyclization in lincomycin biosynthesis. *European Journal of Biochemistry* 271(18): 3678-3683.

Novotná, J. (2008): Studium biosyntetické dráhy antibiotika linkomycinu. Přírodovědecká fakulta, Katedra genetiky a mikrobiologie. Praha, Univerzita Karlova v Praze. Dizertační práce.

Ochman, H., Lawrence, J. G., Groisman, E. A. (2000): Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405(6784): 299-304.

Peschke, U., Schmidt, H., Zhang, H. Z., Piepersberg, W. (1995): Molecular characterization of the lincomycin-production gene cluster of *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Molecular Microbiology* 16(6): 1137-1156.

Petrusek, R. L., Anderson, G. L., Garner, T. F., Fannin, Q. L., Kaplan, D. J., Zimmer, S. G., Hurley, L. H. (1981): Pyrrolo[1,4]benzodiazepine antibiotics. Proposed structures and characteristics of the *in vitro* deoxyribonucleic acid adducts of anthramycin, tomaymycin, sibiromycin, and neothramycin A and B. *Biochemistry* 20(5): 1111-1119.

Sasaki, E., Chia-I, L., Ke-Yi, L. (2012): Construction of the Octose 8-Phosphate Intermediate in Lincomycin A Biosynthesis: Characterization of the Reactions Catalyzed by LmbR and LmbN. *Journal of the American Chemical Society* 134 (42): 17432-17435.

Schlünzen, F., Zarivach, R., Harms, J., Bashan, A., Tocilj, A., Albrecht, R., Yonath, A., Franceschi, F. (2001): Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature* 413(6858): 814-821.

Schroeder, W., Bannister, B., Hoeksema, H. (1967): Lincomycin. III. The structure and stereochemistry of the carbohydrate moiety. *Journal of the American Chemical Society* 89(10): 2448-2453.

Spížek, J., Řezanka, T. (2004): Lincomycin, klindamycin and their application. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63(5): 510-519.

Spížek, J., Novotná, J., Řezanka, T. (2004): Lincosamides: Chemical Structure, Biosynthesis, Mechanism of Action, Resistance, and Applications. *Advances in applied Microbiology* 56:121-154.

Szczepanowski, R., Braun S., Riedel, V., Schneiker, S., Krahn, I., Puhler, A., Schluter, A. (2005): The 120 592 bp IncF plasmid pRSB107 isolated from a sewage-treatment plant encodes nine different antibiotic-resistance determinants, two iron-acquisition systems and other putative virulence-associated functions. *Microbiology-SGM* 151: 1095-1111.

Tendler, M., Korman, S. (1963): 'Refuin' : a Non-cytotoxic Carcinostatic Compound proliferated by a Thermophilic Actinomycete. *Nature* 196(489): 501.

Tenson, T., Lovmar, M., Ehrenberg, M. (2003) :The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *Journal of Molecular Biology* 330(5): 1005-1014.

Thomas, C. M., Nielsen, K. M. (2005): Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 3(9): 711-721

Waksman, S. A. (1947). Citováno podle Bentley, R., Bennett, J.W. (2003): What is an antibiotic or an antibiotic substance? *Mycologia* 39(5): 565–569.

Witz, D. F., Hessler, E. J., Miller, T. L. (1971): Bioconversion of Tyrosine into the Propylhygric Acid Moiety of Lincomycin. *Biochemistry* 10(7): 1128-1133.

Zlatopolskiy, B. D., de Meijere, A. (2004): First total synthesis of hormaomycin, a naturely occurring depsipeptide with interesting biological activities. *Chemistry - A European Journal* 10(19): 4718-4727.